 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10575.1 – Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	2

## MULTIREZIDUÁLNÍ METODA STANOVENÍ MYKOTOXINŮ METODOU LC-MS/MS

### 1 Rozsah a účel

Postup je určen pro analýzu širokého spektra mykotoxinů v obilovinách, krmných surovinách a ostatním rostlinném materiálu. Obsah reziduí mykotoxinů se stanoví kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).


### 2 Princip

Vzorek smočený dostatečným přídavkem vody okyselené 0,1% kyselinou mravenčí se extrahuje vytrpáním do acetonitrilu. Po přidání solí se homogenát odstředí a poté se alikvot supernatantu naředí vodou v poměru (1 : 1). Následuje filtrace a analýza pomocí LC-MS/MS.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu. Rozpouštědla musejí být vhodná pro LC-MS analýzu. Dostačující čistota chemikálií, sorbentů a rozpouštědel se testuje proměřením slepého vzorku.

- 1 Voda, H<sub>2</sub>O ultračistá.
- 2 Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, HPLC grade.
- 3 Kyselina mravenčí, HCOOH, koncentrovaná.
- 4 Síran hořečnatý bezvodý, MgSO<sub>4</sub>, vyžíhaný 12 h při 550 °C
- 5 Chlorid sodný, NaCl, vyžíhaný 12 h při 550 °C.
- 6 Pevná směs solí chloridu sodného a síranu hořečnatého.  
Příprava: Do skleněné vialky se naváží (4 ± 0,1) g bezvodého síranu hořečnatého (4) a (1 ± 0,1) g chloridu sodného (5). Vialka se uzavře víčkem a promíchá se.
- 7 Metanol, CH<sub>3</sub>OH, LC/MS grade.
- 8 Extrakční činidlo: 0,1% roztok HCOOH ve vodě.  
Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se přidá asi 90 ml vody (1), poté se do baňky pipetuje 0,1 ml HCOOH (3), roztok se promíchá a doplní vodou (1) po značku.
- 9 Mravenčan amonný, HCOONH<sub>4</sub>, roztok, c(HCOONH<sub>4</sub>) = 1 mol/l.  
Příprava: 3,1525 g HCOONH<sub>4</sub> se rozpustí v 50 ml vody (1).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10575.1 – Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS	Revize	2

10 Mobilní fáze A: 0,1% HCOOH ve vodě

Příprava: Do 250 ml odměrné baňky se přidá asi 200 ml vody (1), poté se do baňky pipetuje 0,25 ml HCOOH (3), roztok se promíchá a doplní vodou (1) po značku.

11 Mobilní fáze B: 0,1% roztok HCOOH v metanolu s 1mM HCOONH<sub>4</sub>.

Příprava: Do 250 ml odměrné baňky se přidá asi 200 ml methanolu (7), poté se do baňky pipetuje 0,25 ml HCOOH (3) a 0,25 ml 1M HCOONH<sub>4</sub> (9), roztok se promíchá a doplní methanolem (7) po značku.

12 Standardy mykotoxinů.

Certifikované analytické standardy se dodávají v pevném, kapalném nebo odpařeném stavu s deklarovanou čistotou.

Beauvericin (C<sub>45</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) CAS [26048-05-5],

Enniatin A (C<sub>36</sub>H<sub>63</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) CAS [2503-13-1],

Enniatin A1 (C<sub>35</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) CAS [4530-21-6],

Enniatin B (C<sub>33</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) CAS [917-13-5],

Enniatin B1 (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) CAS [19914-20-6],

HT-2 toxin (C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>) CAS [26934-87-2],

T-2 toxin (C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>) CAS [21259-20-1],

Aflatoxin B1 (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) CAS [1162-65-8],

Aflatoxin B2 (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) CAS [7220-81-7],

Aflatoxin G1 (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) CAS [1165-39-5],

Aflatoxin G2 (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>) CAS [7241-98-7],

Fumonisin B2 (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>14</sub>) CAS [116355-84-1],

Fumonisin B1 (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>) CAS [116355-83-0],

Ochratoxin A (C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>15</sub>) CAS [303-47-9],


Zearalenon (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>) CAS [17924-92-4],

Nivalenol (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>) CAS [23282-20-4],

Deoxynivalenol (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>) CAS [51481-10-8],

13 Zásobní roztoky mykotoxinů

Pro analyty, které se dodávají v pevné nebo odpařené formě, se připraví zásobní roztoky o přesné koncentraci ve vhodném rozpouštědle. Navážka pevného standardu se přepočte na deklarovanou čistotu standardu a přidá se příslušné množství rozpouštědla. Některé analyty lze obdržet již v rozpuštěné formě. Roztoky se uchovávají podle doporučení výrobce a jejich stabilita se pravidelně ověřuje.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10575.1 – Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	2

#### 14 Pracovní roztoky mykotoxinů

Pracovní směsné roztoky mykotoxinů se připraví ředěním zásobních roztoků podle požadovaného rozsahu analýzy. Výchozí koncentrace připravených pracovních roztoků musí být vhodné pro sestavení kalibračních směsí.

#### 15 Matricové kalibrační směsi

Matricové kalibrační standardy se připraví ředěním pracovních směsných roztoků extraktem požadované matrice. Přídavek extraktu matrice ke standardu by měl být stejný pro všechny koncentrační hladiny standardu.


### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.:  
ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters), vybavený UPLC kolonou, např.:  
ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),  
ACQUITY UPLC BEH C18, 100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),  
ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters).
- 2 Analytické váhy.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Muflová pec,  $T_{\min} = 550^{\circ}\text{C}$ .
- 5 Horizontální nebo vertikální laboratorní třepačka (250 – 500) kmitů/min.
- 6 Centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, pro objemy 1 ml až 100 ml.
- 7 Centrifugační zkumavky polypropylenové (PP) se šroubovacím víčkem, 15 ml; 50 ml.
- 8 Centrifugační zkumavka Eppendorf, 1,5 ml.
- 9 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 10 Filtrační materiál – stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm nebo centrifugační filtrační zkumavky s velikostí pórů nylonových filtrů 0,2 μm.
- 11 Vialky skleněné, šroubovací, 2 ml.

### 5 Postup

#### 5.1 Příprava vzorku

Do 50 ml uzavíratelné polypropylenové centrifugační zkumavky se naváží ( $2 \pm 0,001$ ) g homogenního vzorku. Poté se přidá 10 ml 0,1% HCOOH (8) a 10 ml acetonitrilu (2). Zkumavka se uzavře a třepe na laboratorní třepačce 20 min při (250 – 500) kmitech/min.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10575.1 – Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	2

Intenzita třepání se upraví tak, aby po celou dobu nedocházelo k sedimentaci vzorku. Poté se přidá pevná směs solí (6). Zkumavka se uzavře a ihned se intenzivně třepe nejméně 30 s. Vzorek se odstředí 5 min při 5000 ot/min, supernatant se převede do 15ml polypropylenových zkumavek a nechá se vymrazit při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  alespoň 2 h. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot/min. Přesně 500  $\mu\text{l}$  supernatantu se převede do zkumavky Eppendorf, kde se smísí s 500  $\mu\text{l}$  vody (1). Po promíchání pomocí Vortexu se roztok zfiltruje nebo se odstředí při 12 000 ot/min a převede do vialky.

### Poznámky

1 Ke vzorku s tuhou konzistencí je vhodné během extrakce do centrifugační zkumavky přidat míchací kamínek.

## 5.2 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakt převedené do 2ml vialky se analyzují metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v aktuální měřicí metodě použité přístrojové sestavy. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci.

## 6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz mykotoxinů jsou podrobně popsány v dokumentu SANTE/11813/2017.


**Kontrola kvality pomocí certifikovaných nebo interních referenčních materiálů:** Pro tento účel lze využít certifikovaných referenčních materiálů s deklarovaným množstvím analytů nebo vzorky získané při účasti v kruhových testech, uchovávané v zamraženém stavu.

**Kontrola kvality pomocí obohacených vzorků:** Pro tento účel lze využít vzorek se zanedbatelným množstvím zájmových analytů, který se obohatí přídavkem mykotoxinů na relevantních hladinách (hladina odpovídající reporting limitu nebo jeho násobku). Povolený rozsah výtěžnosti při rutinní kontrole kvality je 60 % až 140 %.

## 7 Výpočet a vyjádření výsledků

Přítomnost analytu je potvrzena, pokud je odchylka retenčního času daného mykotoxinu v chromatogramu vzorku a kalibračního standardu menší než 2,5 % a pokud se poměr produktových iontů ve spektru vzorku nachází v povoleném intervalu daném poměrem těchto produktových iontů ve spektru kalibračních standardů.

Kvantifikace je prováděna pomocí matricových kalibračních standardů. Kalibrační závislost musí vykazovat minimální charakteristiky  $\text{RSD} < 20\%$  a  $\text{R}^2 > 0,995$ .

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10575.1 – Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	2

V případě podezření na překročení povoleného obsahu reziduí ve vzorku nebo v případě analýzy komplikovaných matic, pro které nelze zajistit matricový slepý pokus, se doporučuje použít metodu standardního přídávku ke vzorku, za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci v daném koncentračním rozsahu.

Obsah mykotoxinů vyjádřený v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

kde

c je koncentrace analytu odečtená z kalibrační křivky v  $\text{ng}/\text{ml}$ ,


$m_a$  hmotnost zkušební vzorku v g,

V objem extraktu v ml,

R ředění.

## 9 Literatura

- 1 ČSN EN 15662 Potraviny rostlinného původu – Stanovení reziduí pesticidů s použitím GC-MS a/nebo LC-MS/MS po extrakci acetonitrilem/separaci a předčištění pomocí disperzní SPE – Metoda QuEChERS.
- 2 Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int*, 2003, vol. 96, no. 2, p. 412 – 431.
- 3 Směrnice komise 2005/38/ES ze dne 6. června 2005, kterou se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství fusariových toxinů v potravinách.
- 4 Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách.
- 5 Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (oznámeno pod číslem K(2002) 3044). Text s významem pro EHP (2002/657/ES).
- 6 Dokument SANTE/11813/2017 – Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
- 7 Dokument SANTE/12089/2016 – Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10575.1 – Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	2

- 8 Doporučení komise ze dne 17. srpna 2006 o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat. Text s významem pro EHP (2006/576/ES).
- 9 Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech. Úř. věst. L 140, 30.5.2002, s. 10.